

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-150998

(43)Date of publication of application : 09.06.1998

(51)Int.Cl.

C12P 17/10
C07D207/12
// (C12P 17/10
C12R 1:74)
(C12P 17/10
C12R 1:72)
(C12P 17/10
C12R 1:645)
(C12P 17/10
C12R 1:84)
(C12P 17/10
C12R 1:19)
(C12P 17/10
C12R 1:38)
(C12P 17/10
C12R 1:265)
C07M 7:00

(21)Application number : 08-331468

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO
LTD

(22)Date of filing : 26.11.1996

(72)Inventor : YASOHARA YOSHIHIKO
HASEGAWA JUNZO

(54) PRODUCTION OF N-BENZYL-3-PYRROLIDINOL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently obtain the subject compound useful as an intermediate for synthesizing medicines, etc., by stereo-selectively reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone by an enzymatic reaction in two layers comprising an aqueous layer containing an enzyme and an organic solvent layer.

SOLUTION: This method for producing optically active N-benzyl-3- pyrrolidinol comprises stereo-selectively reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone by an enzymatic reaction. Therein, the enzymatic reaction is carried out in two layers comprising an aqueous layer containing an enzyme (e.g. glucose dehydrogenase) and an organic solvent layer comprising an ester, an alcohol an aromatic compound, an ether, a ketone, an aliphatic hydrocarbon or a halogenated hydrocarbon which can form the two layers together with the aqueous layer. In an embodiment, the N-benzyl-3-pyrrolidinone is reacted with glucose, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate of coenzyme, etc. Thus, the objective optically active N-benzyl-3-

pyrrolidinol useful as an intermediate for synthesizing medicines, etc., is efficiently obtained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-150998

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月9日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 17/10

C 1 2 P 17/10

C 0 7 D 207/12

C 0 7 D 207/12

// (C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:74)

(C 1 2 P 17/10

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平8-331468

(22) 出願日

平成8年(1996)11月26日

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72) 発明者 八十原 良彦

姫路市日出町3-7-2-605

(72) 発明者 長谷川 淳三

明石市大久保町高丘2丁目13-4

(74) 代理人 弁理士 安富 康男 (外1名)

(54) 【発明の名称】 N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供する。

【解決手段】 N-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元することによる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、前記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行う光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元することによる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、前記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、前記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行うことを特徴とする光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

【請求項2】 有機溶媒層が、エステル類、アルコール類、芳香族類、エーテル類、ケトン類、脂肪族炭化水素類又はハロゲン化炭化水素類からなるものである請求項1記載の光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 β -ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品の合成中間体として有用な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールは、医薬品の合成中間体として有用である。光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法としては、光学活性な化合物から合成する方法や、プロキラルな化合物から出発して不斉合成又は光学分割する方法等が知られている。このような方法として、特開平6-141876号公報には、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する活性を有する酵素の存在下、このN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法が開示されている。しかしながら、この方法はその基質仕込濃度及び基質から生成物への転換率が低く、実用に耐えるものではなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記に鑑み、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供することを目的とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元することによる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、前記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行う光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノール製造方法である。

【0005】本発明者らは、酵素反応の基質となるN-ベンジル-3-ピロリジノンの酵素反応条件下すなわち水中での安定性について調べたところ、非常に不安定で

あることを見出した。このことは、酵素反応中にも基質が分解し結果として生成物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールへの転換率が低下することを意味している。また、生成物であるN-ベンジル-3-ピロリジノールについても同様の調査を行なったところ、酵素反応条件下すなわち水中でも安定であった。本発明者らは、基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンの安定化方法について鋭意検討した結果、N-ベンジル-3-ピロリジノンは、有機溶媒中では安定に存在すること、並びに、水層及び有機溶媒層が同時に存在する二層系中では安定に存在することを見出した。この現象は、水層と有機溶媒層との二層系中では、N-ベンジル-3-ピロリジノンは大部分が有機溶媒層中に溶解しているため、不安定さをもたらす要因である水との接触機会が減少し、結果としてより安定に存在できるためと説明される。

【0006】同様に酵素反応の生成物であるN-ベンジル-3-ピロリジノールも水層と有機溶媒層との二層系中では大部分が有機溶媒層中に存在している。一方、酵素や酵素活性発現に必要な諸成分、例えば、補酵素、エネルギー源等は、一般に水溶性化合物であるため、大部分が水層に存在すると予測できる。従って、基質や生成物との接触機会が減少するため、酵素反応一般で引き起こされる基質や生成物による酵素活性の阻害、それによる低基質仕込濃度及び酵素反応転換率の低下の軽減も期待できる。

【0007】更に、本発明者らは、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素を用いる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法において、反応系中に酵素を含んだ水層及びこの水層と二層を形成する有機溶媒層を同時に存在させれば、酵素を含んだ水中のみで反応をおこなった場合と比較して、得られるN-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度が向上することも見出した。以下に本発明を詳述する。

【0008】本発明においては、基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元する。上記N-ベンジル-3-ピロリジノンは、特開昭54-16466号公報に開示されている方法で合成することができる。すなわち、ベンジリアミンとアクリル酸エチルとをマイケル付加させることにより得られる β -アラニン誘導体に、塩基の存在下クロロ酢酸エチルを反応させる。得られる化合物を金属ナトリウム存在下で環化させ、N-ベンジル-4-カルボエトキシ-3-ピロリドンを得る。このものを塩酸により脱炭酸してN-ベンジル-3-ピロリジノンを得ることができる。

【0009】本発明においては、上記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、上記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行う。上記酵素としては、上記N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する能力を有するものであれば特に限定されず、例えば、

特開平6-141876号公報に例示されている酵素等を挙げることができる。また、上記N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する能力を有する微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を用いることもできる。

【0010】上記微生物としては特に限定されず、例えば、デボダスカス (*Depodascus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロードスポリデウム (*Rhodsporidium*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、オガタエラ (*Ogataea*) 属、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、シュドモナス (*Pseudomonas*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、パシゾレン (*Pachysolen*) 属等に属する微生物等を挙げることができる。このような微生物は一般に、入手又は購入が容易な保存株から得ることができる。また、自然界から分離することもできる。なお、これらの微生物に変異を生じさせてより本反応に有利な性質を有する菌株を得ることができる。また、これら微生物から組換えDNA、細胞融合等の遺伝子工学、生物工学的手法により誘導されるものであってもよい。

【0011】上記菌体の処理物としては特に限定されず、例えば、菌体の乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体又は菌体からの抽出酵素標品等を挙げることができる。上記培養物の処理物としては特に限定されず、例えば、培養物の濃縮物、乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物等を挙げることができる。更に、培養菌体、培養物より酵素を精製し、これを使用してもよい。

【0012】上記有機溶媒層を構成する有機溶媒としては、水層と二層を形成し、上記N-ベンジル-3-ピロリジノン及び生成物であるN-ベンジル-3-ピロリジノールを溶解し、上記酵素の活性を低下させないものであれば特に限定されず、例えば、酢酸エステル、酪酸エステル等のエステル類；1-ブタノール、1-オクタノール等のアルコール類；ベンゼン、トルエン等の芳香族類；ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル等のエーテル類；クロロホルム、塩化メチレン等のハロゲン化炭化水素類；n-ヘキサン、n-デカン等の脂肪族炭化水素類；メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン等のケトン類等を挙げることができる。これらの有機溶媒は、温度、pH等の反応条件による分配率と安定性を考慮して適宜選んで使用される。上記二層系中における水層と上記有機溶媒層との比率は特に制限されない

が、重量基準で、95/5〜5/95の範囲が好ましい。

【0013】上記酵素反応による上記N-ベンジル-3-ピロリジノンの立体選択的な還元は、具体的には、上記酵素を含んだ水性媒体と上記有機溶媒とを混合し、攪拌又は振盪することによって行うことができる。上記酵素反応には、上記酵素以外に補酵素として還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (NADH)、還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 等を必要とするので、反応系にこれらを添加するか、NADH、NADPH等を生成する反応システムを反応系に添加する必要がある。例えば、ギ酸脱水素酵素がギ酸から二酸化炭素と水とを生成する際にNADからNADHを生成する反応や、グルコース脱水素酵素がグルコースからグルコノラクトンを生成する際にNADからNADH又はNADPからNADPHを生成する反応を利用することができる。また、上記微生物が自身の菌体内に本来有している補酵素の生成システムをそのまま用いることもできる。

【0014】上記酵素反応は、反応温度0〜70、pH4〜9の条件で行うことが好ましい。より好ましくは、20〜50℃である。上記酵素反応に有する時間は、用いる基質濃度、酵素量、補酵素量、反応温度等によって異なるが、通常、1〜100時間である。また、上記酵素反応は、有機溶媒層と水層とが混合する程度に攪拌して行うことが好ましいが、その攪拌強度は、用いられる有機溶媒の種類、有機溶媒層と水層との比率、反応の進み具合等により、適宜決定される。

【0015】上記酵素反応終了後、有機溶媒層を集めて、脱水後、有機溶媒を留去して目的の光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを得ることができる。更に、シリカゲルクロマトグラフィーや蒸留等により精製することで高純度の光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを得ることができる。

【0016】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0017】実施例1

N-ベンジル-3-ピロリジノン10mgを栓付き試験管に秤とり、100mMりん酸緩衝液 (pH6.5) 0.5mlと表1に示した有機溶媒0.5mlとを加えてよく攪拌した。これと同じものを3本用意し、うち1本は攪拌後直ちに酢酸エチル4mlと炭酸水素ナトリウムを水層が飽和になるまで加えた後よく攪拌した。この有機層の一部をガスクロマトグラフィーに供し、N-ベンジル-3-ピロリジノンを分析した。残りの2本の試験管は、30℃でそれぞれ18時間と42時間振盪した後、同様にN-ベンジル-3-ピロリジノンを定量した。表1に0時間目のN-ベンジル-3-ピロリジノン

濃度を100%としたときの18時間後、42時間後のN-ベンジル-3-ピロリジノンの残存率を示した。

*mmID×1.0m、カラム温度;200℃、キャリアーガス;窒素、検出;FID

【0018】ガスクロマトグラフィー測定条件:カラム;Uniport B、10%PEG-20M、4.0*

【0019】

【表1】

有機溶媒	有機溶媒中のN-ベンジル-3-ピロリジノン量 (0時間)	残存率 (%)	
		18時間	42時間
酢酸エチル	10.3 mg	100	94
酢酸n-ブチル	9.3 mg	98	95
クロロホルム	10.2 mg	101	97
塩化メチレン	11.1 mg	103	100
トルエン	8.5 mg	100	94
ベンゼン	8.8 mg	97	93
1-オクタノール	7.6 mg	96	84
1-ブタノール	7.2 mg	93	23
メチルイソブチルケトン	8.0 mg	98	92
t-ブチルメチルエーテル	8.7 mg	101	56
n-ヘキサン	7.0 mg	80	46
n-デカン	6.0 mg	102	92
有機溶媒なし		62	46
緩衝液なし (酢酸エチルのみ)		103	104

【0020】実施例2

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に5mlずつ分注して、120℃で20分間蒸気殺菌をおこなった。

培地組成:

グルコース	4	%
酵母エキス	0.3	%
KH ₂ PO ₄	0.1	%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.65	%
NaCl	0.1	%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.8	%
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.06	%

※FeSO₄ · 7H₂O 0.09 %

CuSO₄ · 5H₂O 0.005 %

MnSO₄ · 4~6H₂O 0.01 %

水道水

pH7.0

【0021】これらの液体培地に表2に示す微生物を1

30 白金耳接種して、30℃で24~72時間振盪培養した。つぎに、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、各菌体を100mMリン酸緩衝液(pH6.5)1mlに懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

※ 【0022】

反応液組成:

(1) 上記菌体懸濁液	0.5ml
(2) グルコース	5.4mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸	0.275mg
(4) グルコース脱水素酵素(天野製薬社製)	2.84units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1mg
(6) 酢酸ブチル	0.5ml

【0023】上記の(1)~(6)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、各反応液に3.5mlの酢酸エチルを加えてよく混合し遠心分離ののち有機層中の生成物量を、実施例1に示したガスクロマトグラフィー法により定量した。また、生成物の光学純度をHPLCにより測定した。

【0024】HPLC分析条件:カラム;Chiral★

★cel OB(ダイセル化学工業社製)、溶離液;n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン=99/1/0.1、検出;254nm、流速;1ml/min、溶出時間;(R)体6.1分、(S)体7.9分表2に生成物への変換率と生成物の光学純度をまとめた。

【0025】

【表2】

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0182	54	(S) 97
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0186	34	(S) 98

【0026】比較例1

実施例2と同様に微生物の菌体懸濁液を調製し、反応に酢酸ブチルを添加せずに反応をおこなった。その結果を*

*表3にまとめた。

【0027】

【表3】

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0182	28	(S) 78
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0186	15	(S) 94

【0028】実施例3

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に10ml分注して、120℃で20分間蒸気殺菌をおこなった。

培地組成:

肉エキス	1.0%
ペプトン	1.0%
酵母エキス	0.5%
NaCl	0.3%
水道水	
pH7.0	

【0029】この液体培地にエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) IFO 12734を1白金耳接種して、30℃で24時間振盪培養した。つぎに、培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、30各菌体を100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 2ml※

※に懸濁させて実施例2に示した反応液成分として使用した。20時間反応後、実施例2と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は20%、光学純度は(S) 59%eeであった。

20 【0030】比較例2

実施例3と同様にエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) IFO 12734の菌体懸濁液を調製し、反応に酢酸ブチルを添加せずに反応をおこなったところ、変換率は7%、光学純度は(S) 58%eeであった。

【0031】実施例4

表4に示した微生物について実施例2と同様の操作を行ない、その結果を表4にまとめた。

【0032】

【表4】

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
デボダスカス・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	5.0	(S) 3.7
デバロマイセス・ハンセンii・バリエティ・ハンセンii IPO 0728 (<i>Debaromyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	10.0	(S) 9.9
キャンディダ・マルトース (<i>Candida maltosa</i>) IFO 1976	3.4	(R) 2.6
キャンディダ・トロピカリス (<i>Candida tropicalis</i>) IFO 1401	2.6	(S) 4.6
キャンディダ・ユティリス (<i>Candida utilis</i>) IAM 4815	3.2	(S) 2.8
キャンディダ・ボイディニ (<i>Candida boidinii</i>) IFO 10035	3.5	(S) 4.6
クリプトコッカス・アルビダス IPO 0378 (<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>)	4.2	(S) 6
ピキア・メンブランファシエンズ (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0182	5.4	(S) 9.7
ピキア・メンブランファシエンズ (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0186	3.4	(S) 9.8
ロードスポリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IFO 0413	3.2	(S) 10.0
サッカロマイコプシス・リポリティカ (<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>) IFO 0746	3.9	(S) 9.8
サッカロマイコプシス・リポリティカ (<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>) IFO 1437	3.2	(S) 9.8
トリコスポロン・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	2.8	(S) 9.8
トリコスポロン・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) IFO 1199	2.4	(S) 9.7
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IFO 0948	2.4	(S) 9.7
オガタエラ・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IFO 1476	2.6	(S) 10.0
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IFO 0519	2.4	(S) 8.8

【0033】実施例5

表5に示した微生物について実施例3と同様の操作を行
ない、その結果を表5にまとめた。

* 【0034】

【表5】

*

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
エシェリシア・コリ (<i>Escherichia coli</i>) IFO 12734	2.0	(S) 5.9
エシェリシア・コリ (<i>Escherichia coli</i>) IFO 3806	2.9	(S) 4.9
マイクロコッカス・ルテウス (<i>Micrococcus luteus</i>) IFO 13867	3.4	(S) 9.8
シュドモナス・ディミヌータ (<i>Pseudomonas diminuta</i>) IFO 12697	2.9	(R) 9.5

【0035】実施例6

実施例3に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコに100ml分注したものを25本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌をおこなった。この各々に、実施例3と同様にして培養したシュドモナス・ディミヌータ (*Pseudomonas diminuta*) IFO 12697の培養液2mlを無菌※50

※的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMりん酸緩衝液 (pH6.5) 500mlに懸濁した。これにN-ベンジル-L-ヒロリジノン5gとグルコース10g、還元型ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチドリル酸 (興人社製) 275mg、グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製) 1420units、酢酸ブチル50

11

0mlを加えて30℃で24時間撹拌して反応させた。反応液のpHは6N苛性ソーダ水溶液で6.5に保った。反応後、反応液に酢酸エチル2.5Lを加えて抽出し、水層をさらに酢酸エチル1Lで抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣を蒸留してN-ベンジル-3-ピロリジノール1gを得た。収率20%、光学純度95%ee

(R)体、沸点132~137℃/3mmHg、旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ 3.73° (CH₃OH, C=5)。¹H-NMR δ (CDCl₃): 1.63-1.76 (1H, m)、2.09-2.21 (1H, m)、2.26-2.37 (1H, m)、2.51-2.64 (2H, m)、2.75-2.85 (1H, m)、3.38 (1H, brs)、3.61 (2H, s)、4.24-4.33 (1H, m)、7.19-7.37 (5H, m)。

【0036】実施例7

実施例2に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコに50ml分注したものを50本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌をおこなった。この各々に、実施例2と同様にして培養したピキア・メンブランファシエンス (*Pichia membranaefaciens*) IFO 0182の培養液1mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMりん酸緩衝液 (pH6.5) 500mlに懸濁した。これにN-ベンジル-3-ピロリジノン5gとグルコース10g、還元型ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチドリン酸 (興人社製) 275mg、グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製) 1420units、酢酸ブチル500mlを加えて30℃で48時間撹拌して反応させ*30

反応液組成:

(1) 上記無細胞抽出液	0.5ml
(2) グルコース	5.4mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸	0.26mg
(4) グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製)	2.84units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1mg
(6) 酢酸ブチル	0.5ml

【0039】上記の(1)~(6)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は4%、光学純度は(S)99%eeであった。

【0040】

【発明の効果】本発明のN-ベンジル-3-ピロリジノ※

12

*た。反応液のpHは6N苛性ソーダ水溶液で6.5に保った。反応後、反応液に酢酸ブチル2.5Lを加えて抽出し、水層をさらに酢酸エチル1Lで抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 酢酸エチル/メタノール=2/1) に供して精製し(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノール2.5gを得た。収率49%、光学純度96%ee、沸点132~137℃/3mmHg、旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ -3.73° (CH₃OH, C=5)。¹H-NMR δ (CDCl₃): 1.63-1.76 (1H, m)、2.09-2.21 (1H, m)、2.26-2.37 (1H, m)、2.51-2.64 (2H, m)、2.75-2.85 (1H, m)、3.38 (1H, brs)、3.61 (2H, s)、4.24-4.33 (1H, m)、7.19-7.37 (5H, m)。

【0037】実施例8

実施例2に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml用E坂口フラスコに50ml分注したものを50本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌をおこなった。この各々に、実施例2と同様にして培養したトリコスボロン・ファーメンタンス (*Trichosporon fermentans*) ATCC 10675の培養液1mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMりん酸緩衝液 (pH6.5) 500mlに懸濁した。これを氷冷下ブラウンの細胞破碎器により菌体を破碎後、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液とし、下記の反応液成分として使用した。

【0038】

※ールの製造方法は、上述の構成からなるので、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを効率的に、かつ、工業的規模で生産することが可能である。また、本発明により得られる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールは、光学純度が高いものであり、 β -ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品として有用な化合物の重要中間体である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 R 1:72)

(C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:645)

(C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:84)

(C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 P 17/10

C 1 2 R 1:265)

C 0 7 M 7:00